

# Produção de uma xilanase fúngica por *Komagataella phaffii* em biorreator

Amanda Araújo Souza<sup>1</sup>, Gisele Soares Anastácio<sup>2</sup>, Julia Freitas Daltro Vidal<sup>3</sup>, Sílvia Belém Gonçalves<sup>4</sup>, Thaís Fabiana Chan Salum<sup>5</sup>, Mônica Caraméz Triches Damaso<sup>6</sup>

## Resumo

As xilanases são enzimas que hidrolisam ligações  $\beta$ -1,4 presentes na hemicelulose que compõe a parede celular vegetal. Essas enzimas são produzidas por bactérias, fungos e plantas. Por apresentarem diversas aplicações, como na fabricação de pães, na indústria farmacêutica, na fabricação de celulose e na geração de biocombustíveis, o objetivo desse trabalho foi escalonar a produção de uma xilanase de origem fúngica (F43 GH 10-03) por *Komagataella phaffii* em biorreatores para futura aplicação biotecnológica. Os cultivos foram realizados com fluxo de ar entre 0,1 a 4,0 vvm,  $pO_2$  fixado em 25%, os inóculos com densidade ótica a 600 nm iniciais fixadas em 2, 4 e 6 e temperatura de 30°C. Após fase de crescimento celular, foi estabelecida uma alimentação com glicose 50% (m/v) (fluxo de 4 g/L/h) por modelo exponencial com fator de crescimento  $\mu=0,2$  por 70 h. Inicialmente, a xilanase foi produzida em frascos apresentando atividade de 1,5 UI/mL entre 24 a 72 h de cultivo. A produção da xilanase em biorreator realizada em três condições com  $DO_{600}$  inicial fixada em 2, 4 e 6 mostrou que todos os cultivos apresentaram atividade de xilanase a partir de 14,5 h, com secreção de xilanase ascendente, com atividade variando entre 12 e 23 UI/mL, e a  $DO_{600}$  variando entre 197 e 234, com produção de proteínas totais entre 0,26 e 0,48 g/L. A análise por eletroforese mostrou uma banda de 55 kDa correspondendo à xilanase F43 GH 10-03. Dos três cultivos realizados, a estratégia com  $DO_{600}$  inicial fixada em 4 apresentou a maior atividade específica (70,7 UI/mg de proteína). Essa condição pode ser utilizada para o início de estudos de otimização de produção dessa enzima em biorreator.

**Palavras-chave:** xilanase, *Komagataella phaffii*, escalonamento, biorreatores.

## Introdução

As xilanases são enzimas que realizam a hidrólise da xilana por meio das ligações  $\beta$ -1,4 presentes na hemicelulose que compõe a parede celular vegetal. A xilana junto com a celulose e a lignina formam a parede celular primária e secundária da parede vegetal (Pinto, 2005). As endo  $\beta$ -1,4-xilanases compõem o maior grupo de enzimas que participam da hidrólise da xilana. As endoxilanases são produzidas por diferentes organismos, como bactérias, leveduras, fungos filamentosos e plantas terrestres (Polizeli et al., 2005). As xilanases fúngicas possuem maior aplicação comercial por apresentarem características favoráveis, como atividade em uma ampla faixa de pH,

<sup>1</sup> Bióloga, doutora em Biologia Molecular, colaboradora na Embrapa Agroenergia, amandabernasol@gmail.com

<sup>2</sup> Bióloga, mestre em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, gisele.sa27@gmail.com

<sup>3</sup> Bióloga, mestre em Biologia Molecular, colaboradora na Embrapa Agroenergia, julia.freitasdv@gmail.com

<sup>4</sup> Engenheira química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

<sup>5</sup> Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

<sup>6</sup> Engenheira química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

estabilidade térmica, resistência a proteólise, alta atividade específica e secreção para o meio extracelular, facilitando o processo de obtenção e purificação da enzima (Qiu et al., 2016). As xilanases de origem fúngica apresentam variação de massa molecular entre 7 e 60 kDa, faixa de atividade nos pHs entre 3,5 e 6,0 e em temperaturas de 40 a 60°C (Tan et al., 1987). Essas enzimas também são classificadas segundo sua estrutura primária e os dobramentos dos domínios catalíticos, sendo divididas em diferentes famílias. As endoxilanases então agrupadas nas famílias GH10 e GH11 (Henrissat et al., 1993). As endoxilanases da Família GH10 são enzimas de alta massa molecular com um domínio catalítico acompanhado de um domínio de ligação a carboidratos (CBM), específico para a celulose (Henrissat et al., 1993).

As xilanases apresentam diversas aplicações, como na fabricação de pães, na indústria farmacêutica, na fabricação de papel e celulose e na geração de biocombustíveis, em conjunto com outras enzimas. Apesar de suas inúmeras aplicações industriais, o uso das xilanases com finalidade comercial permanece limitado por diversos fatores, como o alto custo de obtenção das enzimas nativas e baixo rendimento (Sarrouh et al., 2012). Com o desenvolvimento da engenharia genética e de bioprocessos, um novo caminho para produção dessas enzimas se abriu permitindo aplicações de amplo espectro, de forma economicamente mais vantajosa (Datta et al., 2013). A levedura *Komagataella phaffii*, é uma levedura amplamente utilizada na produção de enzimas recombinantes com aplicação biotecnológica e farmacêutica, por secretar grande quantidade de proteínas e atingir altas taxas de densidade celular e possuírem maquinaria necessária para realizar modificações pós-traducionais. Portanto, o objetivo deste trabalho foi produzir uma xilanase de origem fúngica (F43 GH 10-03) por *K. phaffii* em biorreatores de bancada.

## Material e Métodos

### Produção de xilanase em frascos aletados

Um clone da levedura *K. phaffii* expressando a xilanase F43 GH 10-03 contendo o vetor de expressão constitutivo *pGAP $\alpha$ A-Xyl10-03* foi crescido em placas contendo o meio YPD/ágar e zeocina (100  $\mu$ g/mL). Adicionalmente, um clone de *K. phaffii* contendo o vetor vazio *pGAP $\alpha$ A* foi crescido nas mesmas condições e utilizado como controle negativo nos ensaios de expressão em frasco. Uma colônia de cada construção foi inoculada em 5 mL de meio YPD líquido em falcon estéril de 50 mL. Após atingir densidade ótica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de 1 (EasySelect™ Pichia Expression Kit, ThermoFisher) este foi transferido para frascos de 1 L, contendo 100 mL de meio YPD. Os cultivos foram realizados em shaker a 200 rpm a 30 °C. A cada 24 h, uma alíquota de 1 mL foi retirada, avaliada quanto atividade de xilanase e  $DO_{600}$ , e em seguida, a indução foi suplementada com 2% de glicose (m/v), com duração de 72 h.

### Produção de xilanase em biorreator de bancada

A produção da xilanase F43 GH 10-03 em biorreator foi realizada a partir do cultivo de um pré-inóculo em frascos aletados de 1 L contendo 100 mL de meio YPD. Após crescimento de 24 h, as células foram inoculadas em biorreatores em diferentes densidades celulares iniciais ( $DO_{600}$ ): 2, 4 e 6. Para realização desses ensaios foram

utilizados biorreatores Minifors de 2,0 L de capacidade contendo 1 L de meio mineral (Mauher et al., 2006), em cada dorna. Os parâmetros gerais do cultivo foram: pH 5,5, glicose inicial 40 g/L, agitação inicial de 1000 rpm. Após consumo total da fonte de carbono, foi ativada uma cascata com agitação variando entre 100 e 1.200 rpm, para manter a demanda de  $pO_2$  no nível desejado. O fluxo de ar utilizado no sistema foi de 2 vvm (2 litros de ar/minuto/litro de meio) até consumo total da glicose inicial e, posteriormente, na cascata, foi modificado para variar entre 0,1 a 4,0 vvm. O nível de  $pO_2$  dos cultivos foi fixado em 25% (v/v) e as  $DO_{600}$  iniciais das fermentações foram fixadas em 2 para a dorna 1; 4 para a dorna 2 e 6 para a dorna 3. Após fase de crescimento celular, iniciou-se a alimentação com glicose 50% (m/v) (fluxo de 4 g/L por hora) por modelo exponencial utilizando-se como fator de crescimento  $\mu:0,2$  baseado em dados da literatura (Çalik et al., 2015). O tempo total do cultivo para as três dornas foi de 70 h.

### Atividade de xilanase

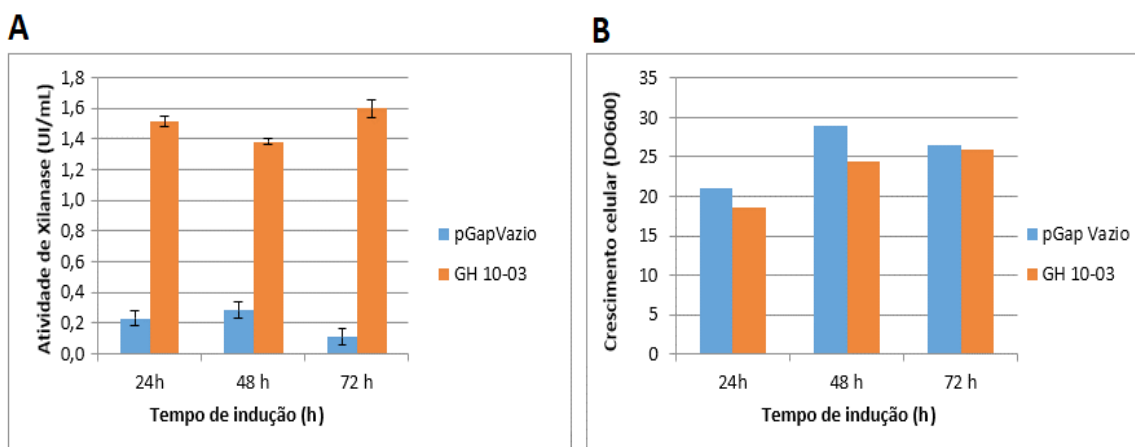
Para o ensaio foi utilizado o substrato xilana Beechwood (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração 7% (m/v) em solução tampão citrato de sódio 100 mmol/L em pH 5,0. A reação foi realizada a partir de 5  $\mu$ L de extrato enzimático e 10  $\mu$ L da solução de xilana incubada por 15 min a 50 °C. Em seguida, foi adicionado 30  $\mu$ L de solução de DNS e a mistura foi aquecida a 95 °C por 10 min. Por fim, adicionou-se 150  $\mu$ L de água destilada e transferiu-se 150  $\mu$ L do ensaio diluído para uma placa de leitura de 96 poços. Os açúcares redutores produzidos pela reação foram medidos pelo método do DNS (Miller, 1959), com a absorbância medida a 540 nm em leitor de placas. A curva padrão foi construída a partir de uma solução de xilose 10 g/L, utilizando-se diferentes diluições (Miller, 1959). Uma unidade de atividade enzimática (UI) é definida como a quantidade de enzima que produz 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio.

### Caracterização do cultivo obtido em biorreator

As análises de densidade celular ( $DO_{600}$ ) foram estimadas por absorbância a 600 nm. Os sobrenadantes do cultivo, utilizados para a quantificação de glicose e proteína foram obtidos por centrifugação a 12.000 x g, por 15 min. A quantificação de glicose foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC com detector de índice de refração (RID) em coluna cromatográfica Aminex HPX-87H (Bio Rad). O perfil das proteínas presentes nos sobrenadantes foi caracterizado por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12%) (Manual Bio Rad) e a coloração das proteínas por prata. A quantificação de proteínas totais dos sobrenadantes foi realizada pelo método BCA (Bicinchoninic acid kit, Sigma). Para a quantificação de proteínas, inicialmente, um procedimento de precipitação desta em amostras do sobrenadante foi realizado com acetona 100% (v/v). As amostras foram pré-incubadas a -20 °C, e a mistura desta com acetona foi incubada por 1 h a -80 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (12.000 x g, 30 min), e os precipitados proteicos obtidos foram lavados 1 vez com acetona, secados em temperatura ambiente e ressuspensos com água destilada na mesma proporção de volume inicial.

## Resultados e Discussão

O ensaio de produção da xilanase fúngica F43 GH 10-03 em frascos aletados mostrou que em 24 h, a produção de enzima foi de aproximadamente 1,5 UI/mL (Figura 1A), mantendo-se nessa faixa até 72 h de cultivo, mesmo com a suplementação de glicose 2% (m/v) a cada 24 h. O aumento do crescimento celular foi observado até 48 h, mantendo-se a mesma  $DO_{600}$  até o final do cultivo (Figura 1B). Portanto, sugere-se que o tempo máximo de cultivo nessa condição utilizada seja de 48 h.



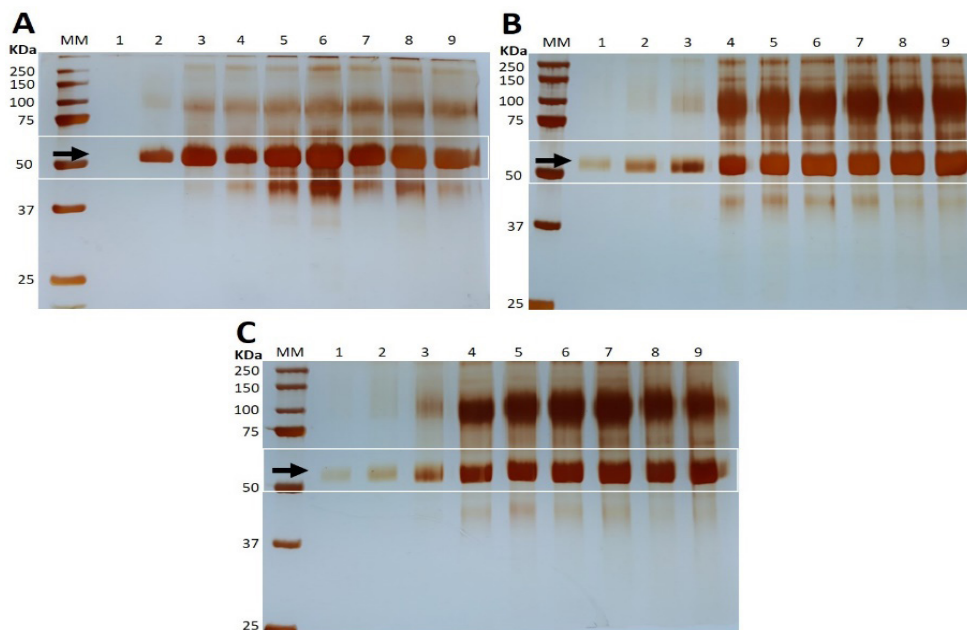
**Figura 1.** Perfil de produção da xilanase GH 10-03 recombinante (A) e do crescimento celular (B) por *K. phaffii* em meio YPD em 72 h de indução. O controle negativo do experimento foi realizado pelo cultivo de *K. phaffii* contendo o vetor pGapZαA vazio.

A produção da xilanase recombinante em biorreator foi realizada em três condições, variando-se a densidade celular ( $DO_{600}$ ) inicial dos cultivos em 2, 4 e 6, mantendo-se o nível de  $pO_2$  controlado em 25%. Os resultados obtidos mostraram que todos os cultivos apresentaram atividade de xilanase a partir de 14,5 h de cultivo. O perfil de secreção de xilanase foi ascendente em todos os cultivos, com valores de atividade enzimática variando entre 12 e 23 UI/mL, de densidade celular ( $DO_{600}$ ) variando entre 197 e 234, e com quantidade máxima de proteína secretada entre 0,26 e 0,48 g/L (Tabela 1). Os resultados obtidos mostraram que dos três cultivos realizados, a estratégia utilizada com  $DO_{600}$  inicial de 4 apresentou maior atividade específica (70,7 UI/mg de proteína secretada) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Perfil das fermentações da cepa de *K. phaffii* em biorreator produzindo a xilanase recombinante F43 GH 10-03 com densidade celular inicial dos cultivos em 2, 4 e 6, e níveis de  $pO_2$  controlados em 25% (v/v).

Xilanase	Tempo (horas)	$DO_{600}$ Inicial	$DO_{600}$ Final	Proteína total g/L	Atividade total (UI/mL)	Atividade específica (UI/mg ptn)
Dorna 1	70,0	2	197,3 ± 2,6	0,48 ± 0,01	12,6 ± 0,3	26,2 ± 0,3
Dorna 2	70,0	4	230,6 ± 6,3	0,26 ± 0,02	18,4 ± 0,4	70,7 ± 0,4
Dorna 3	70,0	6	234,6 ± 8,7	0,46 ± 0,01	23,1 ± 0,1	50,2 ± 0,1

Os resultados obtidos mostraram que houve consumo da fonte de carbono adicionada aos cultivos até 60 h. Após essa etapa, houve acúmulo de glicose em todas as dornas entre 20 e 25 g/L (dados não mostrados), portanto, o fator de alimentação utilizado neste cultivo pode ser reduzido para concentrações menores que 4 g/L por hora. Ao longo dos cultivos houve crescimento celular de forma ascendente até 70 h, com produção de proteínas solúveis (dados não mostrados). Em todos os cultivos foi observada produção de xilanase recombinante, com bandas mais pronunciadas da xilanase recombinante nos cultivos com  $DO_{600}$  inicial de 4 e 6. Os resultados obtidos por eletroforese mostraram que somente duas bandas proteicas foram secretadas por *K. phaffii*, sendo a banda de aproximadamente 55 kDa correspondente à xilanase F43 GH 10-03 (Figura 2). A produção da enzima nos três cultivos foi maior entre 48,5 a 70 h (dados não mostrados).



**Figura 2.** Perfil eletroforético de proteínas solúveis presente no sobrenadante de *K. phaffii* expressando a xilanase F43 GH 10-03 em biorreatores com diferentes densidades celulares ( $DO_{600}$ ) iniciais. A) Eletroforese do cultivo com  $DO_{600}$  inicial 2. B) Eletroforese do cultivo com  $DO_{600}$  inicial 4. C) Eletroforese do cultivo com  $DO_{600}$  inicial 6. O volume de amostra do sobrenadante aplicado no gel foi de 10  $\mu$ L. Raia 1- 14,5 h; raia 2- 17,5 h; raia 3- 23,5 h; raia 4- 39,5 h; raia 5- 42,5 h; raia 6- 48,5 h; raia 7- 51,5 h; raia 8- 66,5 h e raia 9- 70,0 h. Marcador molecular (MM) Bio Rad - Dual Xtra Standards (2- 250 kDa). As setas pretas indicam a banda da xilanase F43 GH 10-03 com 55 kDa.

## Conclusão

Os resultados obtidos na produção e escalonamento da xilanase recombinante por *K. phaffii* mostraram que levedura produziu a enzima com atividade em todos os cultivos realizados em biorreator, a partir de 14,5 h, apresentando maior atividade específica de xilanase de 70,7 UI/mg de proteína no cultivo com  $DO_{600}$  inicial fixada em 4. Nesta condição uma banda proteica com 55 kDa foi observada correspondendo à xilanase

recombinante. Adicionalmente, o cultivo com DO<sub>600</sub> inicial fixada em 4 apresentou crescimento celular semelhante ao cultivo com DO<sub>600</sub> inicial fixada em 6, o que reforça que essa condição pode ser utilizada para o início de estudos de otimização de produção dessa enzima em biorreator.

## Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto YEASTZYME, financiado pelo Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDS) e pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

## Referências

- DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, p. 1-9, 2013.
- HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, p. 781-788, 1993.
- MAURER, M.; KUEHLEITNER, M.; GASSER, B.; MATTANOVICH, D. Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *K. phaffii*. **Microbial Cell Factory**, v. 5, p. 37-47, 2006.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- PINAR, Ç.; ATA, Ö.; GÜNES, H.; MASSAHI, A.; BOYA, E.; KESKINA, A.; ÖZTÜRK, S.; ZERZEA G. H.; ÖZDAMAR T. H. Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. **Biochemical Engineering Journal**, v. 95, p. 20-36, 2015.
- PINTO, G. A. S. et al. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. Fortaleza, CE, **Embrapa**, comunicado técnico, p. 1-8, 2005.
- POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.
- QIU, J.; HAN, H.; SUN, B.; CHEN, L.; YU, C.; PENG, R.; YAO, Q. Residue mutations of xylanase in *Aspergillus kawachii* alter its optimum pH. **Microbiological research**, v. 182, p. 1-7, 2016.
- SARROUH, B.; SANTOS, T. M.; MIYOSHI, A.; DIAS, R.; AZEVEDO, V. Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 2012, p. 1-10, 2012.
- TAN, L. U. L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal Microbiology**, v. 33, p. 689-692, 1987.